

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(32)

(11)Publication number : 11-032757

(43)Date of publication of application : 09.02.1999

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
C12Q 1/04  
C12Q 1/70  
// C12N 7/00

(21)Application number : 09-212668

(71)Applicant : FUJIREBIO INC

(22)Date of filing : 24.07.1997

(72)Inventor : MIYAGAWA EIJI

## (54) HUMAN PARBOVIRUS-INFECTED STRAIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a cell strain manifesting sensitivity to human parbovirus and further manifesting sensitivity to B19 and useful for simple measurement, etc., of infectivity titer.

SOLUTION: This cell strain manifests sensitivity to human parbovirus. The cell strain is preferably KU812 cell infected by the human parbovirus or KU812Ep6, and the infectivity titer of the human parbovirus is preferably measured by the cell strain.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-32757

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月9日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/04

1/70

1/70

// C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/00

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平9-212668

(22) 出願日

平成9年(1997) 7月24日

(71) 出願人 000237204

富士テレビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町 2丁目62番5号

(72) 発明者 宮川 英二

東京都中央区日本橋浜町 2丁目62番5号 富士テレビオ株式会社内

(54) 【発明の名称】 ヒトパルボウイルス感染株

(57) 【要約】

【構成】 ヒトパルボウイルスに感受性を示すヒト細胞株及び該細胞株を用いたヒトパルボウイルスの感染価測定方法。

【効果】 本発明により、B 1 に感受性を示す細胞株を提供し、簡便な感染価測定方法を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトパルボウイルスに感受性を示すヒト細胞株。

【請求項2】 細胞株がヒトパルボウイルスを感染させたKU812細胞である請求項1に記載の細胞株。

【請求項3】 細胞株がKU812Ep6である請求項1または2に記載の細胞株。

【請求項4】 請求項1ないし3に記載の細胞株を用いたヒトパルボウイルスの感染価測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトパルボウイルスに感受性を示すヒト細胞株及び該細胞株を用いたヒトパルボウイルスの感染価測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】パルボウイルスは、直径約20nmほどの最小のDNAウイルスで、ラット、マウス、ブタ、ウシ、ミンク、ヒト等多くの動物に感染することが知られている。この中で、ヒトに病原性を持つヒトパルボウイルスB19 (Lancet, vol 1, p160-161, 1984) (以下本明細書中においては、B19と記載する)はCossartらにより発見され、小児の伝染性紅斑、胎児水腫、溶血性貧血患者では一過性の赤血球造血障害による無形成発作、免疫不全状態の患者では慢性骨髄不全等の原因となることが知られている。また、B19はエンベロープを持たないため、変性剤や有機溶媒に対して耐性を示し、輸血や血液製剤を経由して感染する可能性が示唆されている (Lancet, Vol 343, p211-212, 1994)。

【0003】輸血や血液製剤からの感染を防ぐためには、PCR法やレセプター凝集法等を用いたB19の検出が行われているが、感染予防のためには、ウイルスの存在如何よりも、そのウイルスの感染性の測定が重要となる。B19に感受性を示す細胞としては、JK-1

(Arch. virol., Vol 131, p201-208, 1993)、MB-02 (J. Virol., Vol 67, p562-566, 1993)、UT-7 (Blood, Vol 79, p18-24, 1992) 等が知られている

が、これらの細胞は感受性がそれほど高くないため、B19の感染価を測定には用いることができない。B19の感染価測定には主にCFU-e障害試験が応用されているが、CFU-e細胞は株化されていないため、試験の度に培養を必要し、操作性の面で問題があった。このような状況において、より簡便なインビトロでの感染価測定法の確立が待ち望まれていた。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、B19に感受性を示す細胞株を提供し、簡便な感染価測定方法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、従来の課題を解決すべく、ヒト細胞にB19を感染させる研究を

重ねた結果、ヒト慢性前骨髄性白血病より樹立されたKU812細胞にB19を感染させることに成功し、該感染細胞を用いたB19の感染価測定を可能にし、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、B19に感受性を示す細胞株を提供し、簡便な感染価測定方法を提供するものである。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】本願発明のB19に感受性を示す細胞を樹立するには、ヒトの細胞であればいずれの細胞でも用いることができるが、B19が幹細胞から赤血球へ分化する過程の赤芽球段階で感染することから、赤芽球に分化し得る細胞であることが好ましく、具体的にはKU812が好ましい。ヒト細胞株KU812は、ヒト慢性前骨髄性白血病より樹立された細胞で、多機能分化性の幼若好塩基球である (Masaki Nakazawa et. al., Blood, 73 (7), p2003-2013, 1989)。KU812細胞を用いる場合には、分化を促す因子としてエリスロポイエチンを含む培地を用いて限界希釈法にてクローニングすると、B19に感受性を示す細胞を効率よく得ることができる。

【0009】本発明の樹立細胞を用いるB19の感染価測定は、公知の手法を用いて行うことができる。例えば、B19培養液またはB19陽性血清と本発明の樹立細胞とを混合して培養し、B19特異抗体を用いた蛍光抗体法にて、感染細胞の有無を確認することで、感染価を測定できるが、本発明の感染価測定方法は、これに限定されるものではない。

## 【0010】

【実施例】本発明を以下参考例及び実施例により更に詳細に説明する。

【0011】実施例1 パルボウイルス感染細胞の作製 理化学研究所より購入したKU812細胞を、6IU/mlエリスロポイエチン (以下本明細書中ではEPOと記載する) 及び10%牛胎児血清 (以下本明細書中ではFCSと記載する) を含むRPMI-1640培地 (以下本明細書中では培地Aと記載する) を用いて希釈し、96ウエルプレートに細胞1個/ウエルになるように分注した。37℃で1週間培養後、成育したウエルから細胞を回収した。同様の方法にて培地Aで希釈、培養を2回繰り返す、最終的に限界希釈法によりクローニングされたクローンとして100クローンを得た。

【0012】この100クローンそれぞれを、培地Aを用いて希釈し、 $2 \times 10^4$  細胞/mlの細胞懸濁液を調製した。その50μlを96ウエルプレートに分注し、更に、組織培養50%感染価 (以下本明細書中ではTCID<sub>50</sub>と記載する)  $10^3$ /mlになるよう培地Aで希釈したヒトパルボウイルス液を各ウエルに50μlづつ加え、7日間培養した。培養後、ヒトパルボウイルスに特異的なモノクローナル抗体 (MAB8292、ケミコンインターナショナル社製) を用いた間接蛍光抗体法

で、ヒトパルボウイルス感染細胞を確認した。

【0013】 間接蛍光抗体法は、培養した細胞をスライドグラスにマウントし、メタノールで固定化後、500倍希釈したモノクローナル抗体MAB8282と1時間反応させた。スライドグラスを洗浄後、FITC標識抗マウスIgG抗体と1時間反応させ、蛍光顕微鏡下で陽性率を確認した。この時の感染効率は10～60%で、クローンにより異なっていた。

【0014】 この中から、感染効率の高いクローンとしてKU812Ep6株を取得した。尚、KU812Ep6株は工業技術院生命工学工業研究所微生物寄託センターに寄託され、その寄託番号はFERM P-16310である。

#### 【0015】 実施例2 感染価測定

実施例1で作製したヒトパルボウイルス感染細胞KU812Ep6を培地Aで継代培養し、 $2 \sim 5 \times 10^4$  細胞/mlになるよう希釈した。この懸濁液100 $\mu$ lを、48ウェルプレートに分注した。次に、ヒトパルボウイルス感染検体A～Gを $10^8$  連続希釈し、それぞれ100 $\mu$ lを添加後、37℃で1時間インキュベートした。次に、300 $\mu$ lの培地Aを添加し、5%二酸化炭素ガス下、37℃で培養を開始した。1週間培養後、細胞を回収し、実施例1と同様の間接蛍光抗体法により、蛍光顕微鏡下で感染が確認される検体の最終希釈濃度を確認した。感染価はリード・ミンチの方法に従ってTCID<sub>50</sub>で表示した。結果を表1に示す。

#### 【0016】

【表1】

検体番号	TCID <sub>50</sub> (log)
A	8.25
B	7.25
C	9.5
D	6.7
E	6.7
F	6.5
G	8.5

#### 【0017】 実施例3 感染価測定系のウイルス不活化試験への応用

ヒトパルボウイルス感染価TCID<sub>50</sub>10<sup>8</sup>/mlのウイルス液を30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃の水浴中で30分間インキュベートした後、残存するウイルス感染価を実施例2の感染価測定の方法に従って実施した。培地Aで $2 \sim 5 \times 10^4$  細胞/mlになるよう希釈したヒトパルボウイルス感染細胞KU812Ep6の懸濁液100 $\mu$ lを48ウェルプレートに分注した。次に、各温度でインキュベートしたウイルス液を10n連続希釈し、それぞれ100 $\mu$ l添加後、37℃で1時間インキュベートした。次に、300 $\mu$ lの培地Aを添加し、5%二酸化炭素ガス下、37℃で培養を開始した。1週間培養後、細胞を回収し、実施例1と同様の間接蛍光抗体法により、蛍光顕微鏡下で感染が確認される検体の最終希釈濃度を確認した。感染価はリード・ミンチの方法に従ってTCID<sub>50</sub>で表示した。結果を図1に示す。50℃30分の熱処理ではパルボウイルスB19は全く不活化されず、60℃30分の熱処理でも感染性は残存した。70℃30分の熱処理では感染性は全て失われた。

#### 【0018】

【発明の効果】 本発明により、B1に感受性を示す細胞株を提供し、簡便な感染価測定方法を提供することができるようになった。

#### 【図面の簡単な説明】

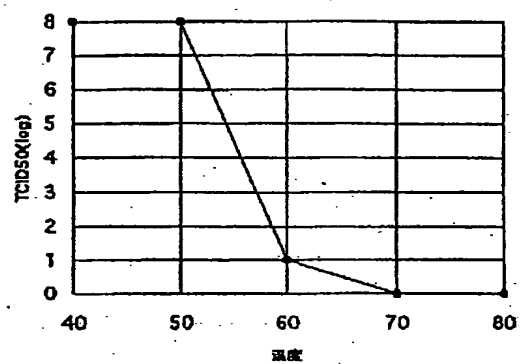
【図1】 熱処理によるパルボウイルスB19の不活化を示す図である。

(4)

特開平11-32757

【図1】

熱によるパルボウイルスB19の不活化



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**